فصلنامه

دانش آزمایشگاهی ایران

سال یازدهم ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۴۰۲ ■ شماره پیاپی ۴۳

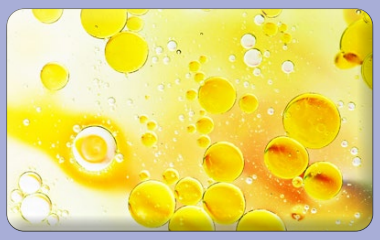
ISSN 2538-3450

تعیین و ارزیابی منابع عدم قطعیت در آزمون کشش

حضور شبکه آزمایشگاهی و مراکز عضو در چهاردهمین نمایشگاه بین‌المللی فناوری نانو

ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری در آزمایشگاه‌ها با ارائه یک نمونه عینی

مروری بر اهمیت و طبقه‌بندی روش واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی و کاربرد آن در صنایع غذایی



ساخت نانوزیست کامپوزیت کیتوسان-هالوسیت به‌عنوان جاذب برای روش ریزاستخراج فیلم نازک

کالیبراسیون مرتبه بالا و آنالیز داده‌ها در کروماتوگرافی

نقش پایگاه داده COMAR برای مواد مرجع

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir

نویسندگان

عباس عابدفر[1*]

فاطمه عباس‌زاده[2]

۱. دکتری صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه گیلان
۲. دانشجوی دکتری صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

*a.abedfar@guilan.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۲۸

واژه‌های کلیدی

روش RT-PCR، طبقه‌بندی روش، تشخیص باکتری‌های پاتوژن، تشخیص آلرژن‌های غذایی، تقلبات مواد غذایی.

مروری بر اهمیت و طبقه‌بندی روش واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی و کاربرد آن در صنایع غذایی

چکیده

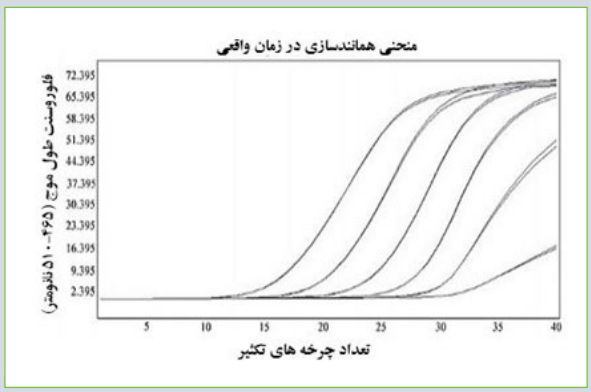
پیشرفت فناوری مولکولی (سبب تسریع در شناسایی صحیح گونه‌های نزدیک به هم در مواد اولیه، نمونه غذایی) منجر به فراوانی آزمون‌های مولکولی برای کاربردهای وسیعی نظیر انگشت‌نگاری ژنتیکی به‌منظور تشخیص هویت، تشخیص بیماری‌های عفونی، حساسیت‌های غذایی (آلرژی‌ها نظیر گلوتن غلات و لاکتوز شیر) و تشخیص تقلبات در صنعت غذا، امری ضروری به نظر می‌رسد. بی‌شک، به کارگیری روش‌های مرسوم (وابسته به کشت) برای شناسایی بیماری‌های عفونی، آنتی‌بیوتیک‌ها و میکروارگانیسم‌های پاتوژن‌ها در صنعت فرآوری مواد غذایی امری پرهزینه و بسیار وقت‌گیر خواهد بود؛ از این رو، به کارگیری روش‌های نوین مولکولی مستقل از کشت، نظیر واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی[1] با کمترین زمان و دقت بسیار بالا برای ارزیابی گونه‌های ایجاد کننده عفونت و کیفیت و ایمنی مواد غذایی معرفی شد. در این روش نوین، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] با مولکول‌های گزارشگر فلورسنتی انجام گرفته و محصول تکثیری، طی هر چرخه گزارش می‌شود؛ بر این اساس، ضمن حساسیت و اختصاصیت بالا، داده‌های قابل اعتماد با کمترین خطر آلودگی، قابلیت در تعیین کمیت سطوح بیان ژن را خواهد داشت؛ بنابر این، جایگزین مناسبی برای PCR معمولی است. از این رو، در این مقاله مروری، بر اهمیت این روش و روش‌های مختلف RT-PCR، مزایا و کاربرد آن در تشخیص آلرژن‌های غذایی به خصوص گلوتن و در نهایت، تقلبات در مواد غذایی پرداخته می‌شود.

مقدمه

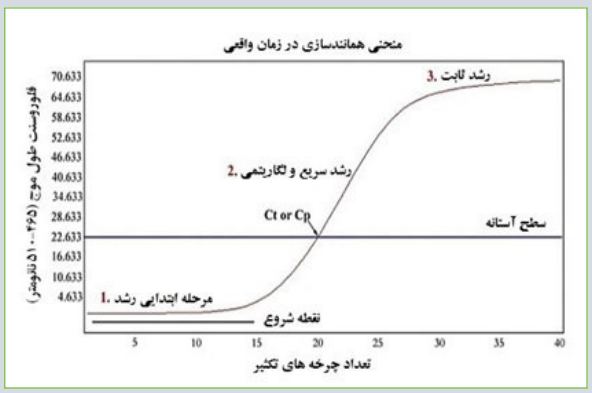
واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی که به‌عنوان واکنش زنجیره پلیمراز کمّی[3] شناخته می‌شود، یک روش آزمایشگاهی زیست شناسی مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره پلیمراز است. این روش، تکثیر یک مولکول DNA را در طول PCR (در زمان واقعی) و نه در پایان آن، مورد هدف قرار می‌دهد. از این روش می‌توان به‌عنوان یک آزمون کمّی و نیمه کمّی استفاده کرد [۱]. در این روش، یک ماده فلورسنت در هر چرخه از واکنش آزاد می‌شود که میزان آزادسازی آن با مقدار محصولات تکثیر شده متناسب است. این مقدار از فلورسنت با استفاده از یک نمایانگر[4] شناسایی و ثبت می‌شود و در نهایت، نتایج RT-PCR شامل منحنی‌های همانندسازی است که با استفاده از دستگاه، ترسیم خواهد شد (شکل (۱)).

این منحنی‌ها، در واقع نشان‌دهنده تصویری از فرآیند در حال انجام و تکثیر محصولات است که می‌تواند برای تعیین کمیت مقادیر اولیه مولکول‌های DNA الگو با دقت بالا در محدوده وسیعی از غلظت‌ها استفاده شود [۲ و ۳]. علاوه‌بر این، در شکل (۲) مراحل رشد میکروبی در فازهای مختلف در طی فرآیند PCR نشان داده شده‌است.

استفاده از RT-PCR کمّی، در بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی-مولکولی، کشاورزی و صنایع غذایی در حال افزایش بوده و جایگزین خوبی برای PCR معمولی است. در واقع این روش بر پایه PCR معمولی بوده و امکان آنالیز داده‌ها در آن وجود دارد. مزیت اصلی qPCR نسبت به PCR معمولی این است که غلظت DNA اولیه با دقت و حساسیت بالایی تعیین می‌شود. بدین ترتیب، نتایج به‌دست آمده می‌تواند به‌صورت کیفی و یا کمّی باشد [۴]. از دیگر مزایای qPCR این است که واکنش‌ها در یک لوله در بسته انجام شده و داده‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند که با این روند، دیگر نیازی به دستکاری‌های پس از تکثیر نبوده و از این رو، امکان آلودگی کاهش می‌یابد [۵]. سازگاری و مزیت فناوری RT-PCR در مطالعه‌های متعدد از قبیل تعیین کمیت و تعیین ژنوتایپ عوامل عفونی، بحث کشاورزی و فناوری زیستی، بررسی بیان ژن‌ها، آنالیز DNA متیله شده و میکرو RNA و ژنوتایپینگ (شناسایی جهش‌ها، آنالیز پلی مورفیسم تک نوکلوتیدی و شناسایی تغییرات کروموزومی)، تایید اثربخشی دارو درمانی و مطالعات پزشکی قانونی و تشخیص گونه‌های پارازیت در مواد غذایی و آب است [۶]. اجزای اصلی qPCR شامل، ترموسایکلر با یک منبع نوری (لامپ، لیزر یا LED) یک سیستم نمایانگر فلورسنت (فلوریمتر) و همچنین نرم‌افزاری به‌منظور رسم منحنی تکثیر DNA با استفاده از داده‌های فلورسنت است [۷]. همچنین حضور ترکیبات رنگی ایمن (نظیر اتیدیوم بروماید، سایبرگرین I و اواگرین) در این سازوکار واکنشی، قابلیت ردیابی فرآورده تکثیری اختصاصی و غیراختصاصی برای DNA دو رشته‌ای هدف و پروب نشاندار با فلوروفور متصل شده به الیگونوکلئوتیدها را خواهد داشت [۵].



شکل (۱): منحنی‌های همانندسازی در نمای نیمه لگاریتمی به‌دست آمده از رقت‌های مختلف DNA هدف. منحنی ورودی، رگرسیون به‌دست آمده از مقادیر CT [۲۵].

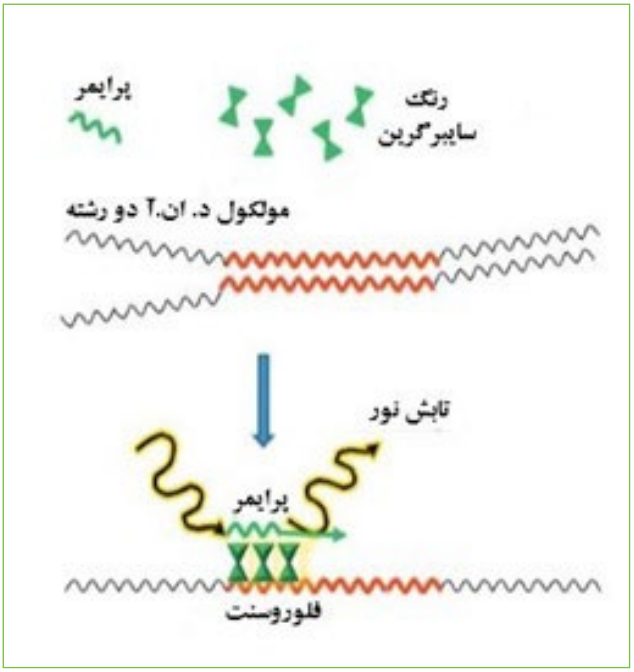


شکل (۲): منحنی‌های همانندسازی PCR در طی فرآیند رشد میکروبی [۲۵].

طبقه‌بندی شیمیایی RT-PCR به‌منظور تعیین کمیت اسیدهای نوکلئیک

تشخیص غیر اختصاصی (RT-PCR)

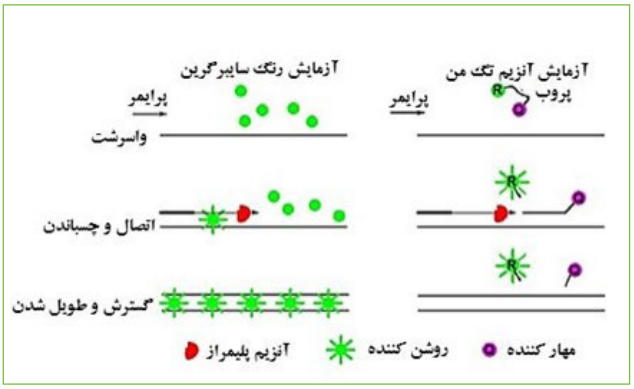
در این روش، یک رنگ به DNA متصل شده که باعث افزایش عملکرد کوانتومی فلورسانس رنگ می‌شود. بنابراین، افزایش محصول DNA در طی PCR باعث افزایش شدت فلورسانس در هر چرخه شده و شدت فلورسانس با یک ردیاب اندازه‌گیری می‌شود. رنگ فقط درصورت اتصال به DNA فلورسنت می‌شود. این روش، این مزیت را دارد که فقط با یک جفت آغاز می‌شود. هدف توالی را می‌توان در لوله با استفاده از انواع مختلف رنگ کنترل کرد (شکل (۳)).



شکل (۳): روش Real Time PCR با استفاده از رنگ‌های اتصال شونده DNA دو رشته‌ای [۲۵].

◆ ساختار و نمونه رنگ‌های متصل شونده به DNA

طیف گسترده‌ای از رنگ‌های فلورسنت متصل شونده به DNA به‌صورت تجاری وجود دارد که شامل اتیدیوم بروماید، یو پرو وان[۵]، سایبرگرین I، سایبرگلد، سیتو[۶]، بوکستو[۷]، بیبو[۸] و اواگرین است. استفاده از این رنگ‌ها باعث شناسایی محصولات اختصاصی و غیراختصاصی و محصولات پرایمر-دایمر تولیدی در طول واکنش qPCR می‌شود (شکل (۴)). پرمصرف‌ترین رنگ، سایبرگرین I است که در شرایط استاندارد واکنش PCR، بار مثبت آن به اتصال قوی این رنگ به DNA دو رشته‌ای کمک می‌کند [۸]. کمپلکس DNA– رنگ حاصل، نور آبی با طول موج (λmax=۴۹۷) نانومتر را جذب کرده و نور سبز را با طول موج (λmax=۵۲۰) نانومتر ساطع می‌کند. با توجه به این که در طی فرآیند PCR محصولات غیراختصاصی و پرایمر-دایمرها می‌توانند شکل گیرد، آنالیز منحنی ذوب[۹] به‌منظور بررسی اختصاصیت قطعات تکثیر شده توصیه می‌شود [۹].



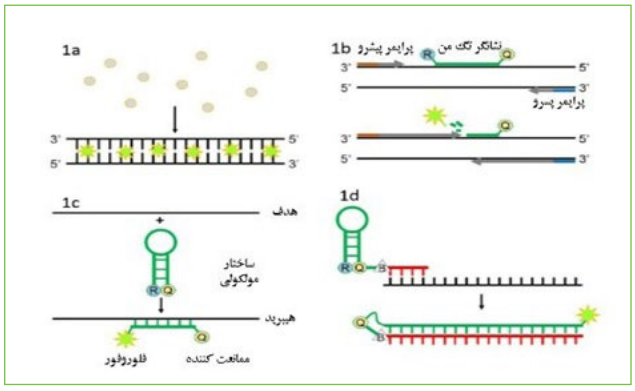
شکل (۴): نمایی از سنجش SYBR Green I و TaqMan در طی مراحل PCR [۲۵].

◆ کاربرد، مزایا و معایب روش Real Time PCR

سایبرگرین I را می‌توان به‌منظور شناسایی توالی‌های DNA در واکنش PCR و همچنین به‌طور عمده برای شناسایی عوامل عفونی، سویه پاتوژن در مواد غذایی، بررسی بیان ژن، شناسایی جهش، شناسایی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی و همچنین شناسایی ارگانیسم‌های اصلاح شده از نظر ژنتیکی[۱۰] استفاده نمود. به لحاظ اقتصادی، هزینه رنگ سایبرگرین I در مقایسه با پروب‌های اختصاصی به مراتب پایین‌تر است. با وجود محبوبیت سایبرگرین I اما دارای محدودیت‌هایی از قبیل پایداری محدود و همچنین مهار PCR است [۱۰].

◈ تشخیص اختصاصی (RT-PCR)

پروب‌های (کاوشگر) گزارشگر فلورسنت، فقط DNA حاوی توالی مکمل پروب را تشخیص می‌دهد. بنابراین، استفاده از گزارشگر کاوشگر به‌طور قابل توجهی ویژگی‌های اختصاصی را افزایش می‌دهد و این روش را حتی در حضور DNA امکان‌پذیر می‌کند. با استفاده از برچسب‌های مختلف رنگ، می‌توان از پروب‌های فلورسنت در روش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه[۱۱] برای کنترل هدف در همان لوله استفاده کرد. همچنین کاوشگرهای گزارشگر فلورسنت از تداخل اندازه‌گیری‌های ناشی از دیمرهای آغازگر که از محصولات جانبی بالقوه نامطلوب در PCR هستند، جلوگیری می‌کند [۱۱]. پروب‌های گزارشگر فلورسنت از اثر توانایی دایمرهای آغازگر جلوگیری نمی‌کنند و ممکن است باعث تولید محصولات مورد نظر در واکنش شوند (شکل (۵)).



شکل (۵): روش RT-PCR با روش کاوشگر گزارشگر فلورسنت یا الیگونوکلئوتیدهای متصل به فلوروفور (پرایمر یا پروب) [۲۵].

◆ پرایمر- پروب‌ها

الیگونوکلئوتیدها متشکل از توالی نوکلئوتیدی در یک مولکول واحد بوده که می‌توان به سه گروه پروب‌های سنجاق سری، سیکلیکونز و آنگر طبقه‌بندی کرد. فلورسنت ساطع شده طی مرحله گسترش توالی (qPCR) شناسایی و اندازه‌گیری می‌شود. استفاده از این پرایمرها منجر به تکثیر محصولات غیر اختصاصی در طول واکنش PCR می‌شود. بنابراین، آنالیز منحنی ذوب برای تعیین کارایی واکنش در نظر گرفته می‌شود [۱۲].

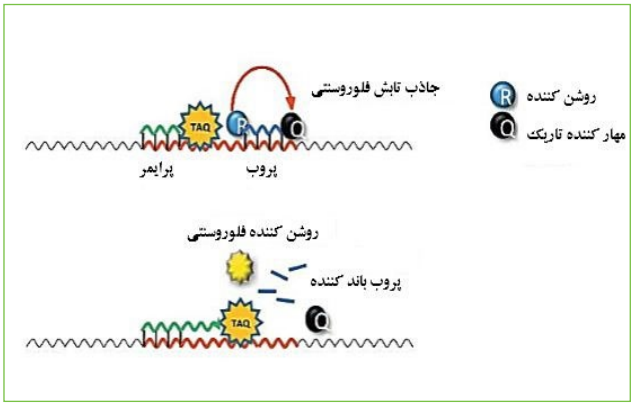
◆ پروب‌ها

پروب‌ها، الیگونوکلئوتیدهایی هستند که شامل یک ساختار فلوروفور دهنده و یک فلوروفور پذیرنده است. در حالت کلّی، دو نوع از آن شامل پروب‌های هیدرولیز و هیبریداسیون وجود دارد.

۱. پروب‌های هیدرولیز کننده:

چگونگی عملکرد این پروب‌ها به میزان فعالیت '۵ به '۳ اگزونوکلئازی Taq پلیمراز متکی است که با این ویژگی خود، پروب متصل را در طول واکنش تکثیر تخریب و همچنین از انجام آنالیز منحنی ذوب ممانعت می‌کنند. در این سیستم، فلورسنت در پایان مرحله گسترش، محاسبه می‌شود که متناسب با مقدار محصول اختصاصی تکثیر شده است [۱۳ و ۱۴].

از مهمترین نوع این پروب‌ها می‌توان به پروب تکمن[۱۲] اشاره نمود. در واقع در این پروب، در انتهای '۵ خود حاوی مولکول دهنده فلورسنت و در انتهای '۳ خود دارای مولکول پذیرنده فلورسنت است (شکل (۶)).

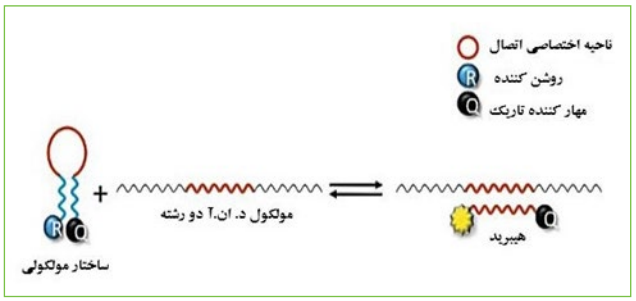


شکل (۶): سازوکار تشخیص با استفاده از کاوشگر تکمن. فعالیت '۵-'۳ پلیمراز و اگزونوکلئاز تک پلیمراز دی.ان.ای. R: روشن کننده و Q: مهارکننده [۲۵].

از این سیستم می‌توان در شکل‌های تکی و چندتایی برای شناسایی ویروس، تعیین کمیت بار ویروس یا باکتری، بررسی بیان ژن، تأیید نتایج میکرواری، افتراق آللی، شناسایی جهش، تشخیص پلیمورفیسم تک نوکلئوتیدی و GMO استفاده کرد [۱۵].

۲. پروب‌های هیبریداسیون:

از این پروب برای اندازه‌گیری فلورسنت ساطع شده در طول مرحله اتصال یا مرحله گسترش استفاده می‌شود. از قابلیت‌های این پروب در مقایسه با پروب‌های هیدرولیز کننده، توانایی آنالیز قطعات تکثیر شده توسط منحنی ذوب است. در واقع، میزان نور فلورسنت اندازه‌گیری شده ارتباط مستقیمی با میزان تکثیر DNA هدف، طی واکنش qPCR دارد (شکل (۷)). از مهمترین پروب‌های این دسته، هایپ پروب[۱۳] و یا پروب اف‌آرای‌تی[۱۴] نام دارد که در سازوکار عملکرد آنها توالی‌های این دو پروب طوری طراحی می‌شوند تا در جهت سر به دم با توالی‌های DNA هدف هیبرید شوند به طوری که دو فلوروفور در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند. طی مرحله اتصال که دو پروب در مجاورت هم قرار دارند، کوئنچر با توجه به این واقعیت که انرژی آزاد شده از مولکول گزارشگر از قبل باعث برانگیختگی آن شده‌است، نور فلورسنت ساطع می‌کند [۱۶].



شکل (۷): مراحل هیبریداسیون PCR در تاثیر ترکیبات فلوروفور و خاموش کننده [۲۵].

چالش‌های اساسی در تشخیص آلودگی مواد غذایی با روش RT-PCR

مهمترین تقاضای اصلی مصرف کنندگان مواد غذایی، ضمانت بر ایمنی و کیفیت مواد غذایی است. وجود پاتوژن‌های منتقل شده از غذا و خطر بالقوه آنها، به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی (GMOs) در تولید مواد غذایی و همچنین بحث برچسب‌گذاری صحیح در غذاهای مناسب برای افراد گیاه‌خوار از جمله موضوعاتی است که جامعه، خواستار شفافیت کامل آن است. اعمال کنترل‌های دوره‌ای در برنامه‌های ارزیابی کیفیت صنایع غذایی روشی برای ارضای این خواسته‌ها است. استفاده از روش RT-PCR به‌عنوان رویکردی جایگزین و امیدوار کننده در تشخیص مواد غذایی تبدیل و همچنین تقلبات در مواد غذایی مطرح شده‌است. این روش دارای مزیت‌های بالاتری در مقایسه با روش‌های کشت مرسوم است، از جمله سرعت، حساسیت تحلیلی عالی و گزینش‌پذیری و پتانسیل کمّی‌سازی. با این حال، استفاده از تجهیزات و معرف‌های زیستی گران قیمت، نیاز به کارشناسان متخصص و همچنین فقدان پروتکل‌های استاندارد، اجرای عملی آن برای نظارت و کنترل مواد غذایی را سخت و مختل می‌کند [۱۷].

◈ چالش‌های فعلی در این روش

از مزایای ذاتی روش‌های همانندسازی سریع می‌توان به چرخه همانندسازی کوتاه‌تر، بهبود محدودیت‌های تشخیصی، عملکرد اختصاصی و پتانسیل اتوماسیون شدن اشاره نمود که باید اجرای همه آنها را در آزمایشگاه‌های مواد غذایی تقویت کرد [۱۸]. از موضوعات اصلی به‌منظور انطباق موثر روش‌های مولکولی در آزمایشگاه‌های مواد غذایی عبارتند از:

◆ توسعه راهبردهای علمی-منطقی با کاربری آسان برای پیش آزمون PCR در نمونه‌های غذایی؛

◆ طراحی و کاربرد کنترل‌های تحلیلی؛

◆ توسعه راهبردهایی برای استفاده کمّی از RT-PCR برای نمونه‌های غذایی؛

◆ اتوماسیون در کل فرآیند تحلیلی و در نهایت، برای مورد خاص در حوزه میکروبیولوژی مواد غذایی به‌منظور تشخیص واضح ارگانیسم‌های زنده حین فرآیند تکثیر و نقطه ایجاد آلودگی [۱۹].

تضمین مستمر ایمنی، کیفیت غذاها و در اختیار داشتن ابزارهای علمی برای مقابله با چالش‌های ناشی از تهدیدات احتمالی نوظهور، مستلزم توسعه روش‌های نوین و اصلاح روش‌های تحلیلی است. از این رو، در چند دهه اخیر منابع قابل توجهی به سمت این تلاش‌ها هدایت شده‌است. با این حال، از زمان اجرای روش‌های جدید یا بهبود یافته، تلاش‌ها در بیشتر موارد به منافع ملموس برای مصرف‌کننده و ذینفعان تبدیل نشده‌است و باید یک حرکت متمرکز به سمت روش‌های اثبات شده از آزمایشگاه‌های دانشگاهی و اجرای عملیاتی آنها در صنعت باشد. مشارکت شرکت‌های تولیدی، تولیدکنندگان مواد غذایی، شرکت‌های خرده‌فروشی و سازمان‌های ایمنی مواد غذایی برای اطمینان از رویکردی آگاهانه و ساختار یافته به کیفیت و ایمنی در مراحل حیاتی در فرآیندهای تولید مواد غذایی ضروری و بسیار حائز اهمیت است. تعقیب این اهداف، مستلزم یک ابتکار بزرگ بین‌المللی است، اما پاداش آن در تمام سطوح در جامعه آشکار خواهد شد [۲۰].

تشخیص سالمونلا [15] بیماری‌زا در مواد غذایی با روش RT-PCR

عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری پاتوژن گرم منفی «سالمونلا انتریکا» به‌عنوان یک نگرانی مهم بهداشت عمومی در سراسر جهان است. سالمونلاها گروه پیچیده‌ای از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند که از دو گونه، شش زیرگونه و بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ تشکیل شدند که در اصل از طریق خوردن غذا یا خوراک آلوده، باعث ایجاد بیماری‌های محدود شونده گوارشی در طیف وسیعی از پستانداران می‌شوند. در دهه گذشته، سنجش‌ها با روش RT-PCR برای تشخیص سریع سالمونلاها در مواد غذایی یا خوراک بالقوه آلوده توسعه یافته‌اند [۲۱].

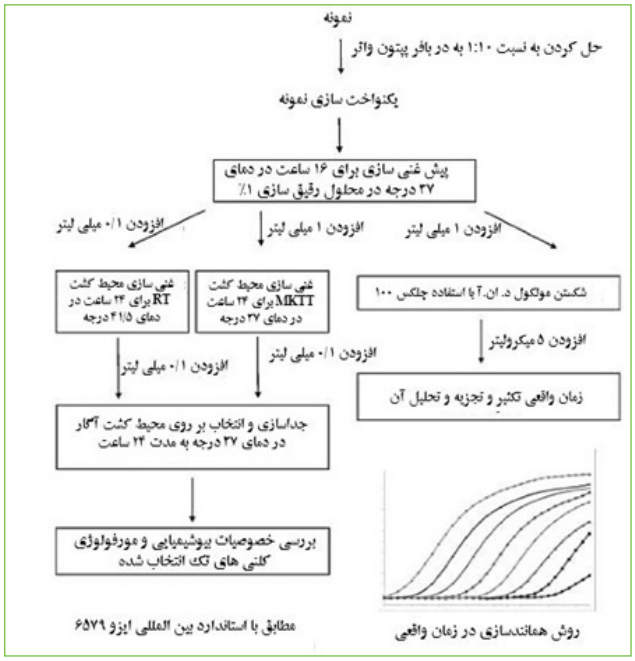
بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیصی، RT-PCR را به‌عنوان روشی سریع برای تشخیص سالمونلا در نمونه‌های غذایی، محیطی و انسانی اجرا کرده‌اند یا قصد دارند آن را معرفی کنند. به‌عنوان روش تحلیلی برای تشخیص و جداسازی سالمونلا در مواد غذایی، یک روش پذیرفته شده بین‌المللی در سند استاندارد EN ISO 6579:2002 با حساسیت ۱ CFU به ازای هر ۲۵ گرم غذایی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است [۲۲]. روش جداسازی سالمونلا در مواد غذایی از چهار مرحله متوالی تشکیل شده‌است [۲۳]:

◆ غنی‌سازی از قبل در محلول رقیق سازی با محیط مایع غیرانتخابی آب پپتون بافر [16]؛

◆ غنی‌سازی در دو محیط کشت مایع انتخابی مختلف، راپاپورت-واسیلیادیس [17] و مولر کافمن تتراتیونات نوبیوسین [18]؛

◆ شناسایی روی محیط کشت زایلوز لیزین دئوکسی کولات آگار [19] و یک محیط کشت عمومی آگار؛

◆ تأیید هویت با آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب (شکل (۸)).



شکل (۸): مقایسه روش کشت استاندارد و روش RT-PCR برای تشخیص سالمونلا در غذا [۲۵].

تعداد زیادی از روش‌های RT-PCR برای تشخیص گونه‌های سالمونلا منتشر شده‌است. علاوه‌بر این، چندین کیت و تجهیزات برای این منظور به‌صورت تجاری در دسترس هستند. با این حال، هنوز چالش‌هایی باقی مانده تا روش‌های مولکولی جایگزین روش‌های مبتنی بر کشت شوند. یکی از چالش‌های پیش روی کارشناسان واکنش زنجیره پلیمراز در زمان واقعی، تعداد کم روش‌های استاندارد و رسمی تایید شده برای تشخیص و تجزیه و تحلیل پاتوژن‌های منتقل شده (نظیر سالمونلا) از مواد غذایی به انسان است. چالش دیگر، قابل قبول بودن نتایج مثبت RT-PCR در یک نمونه است. مقامات قانونی اغلب خواستار تایید نتیجه با جداسازی گونه‌های میکروبی هستند؛ بنابراین، لازم است برای ادعای مثبت بودن نمونه‌ها، که دیگر نیازی به جداسازی سویه نخواهد بود، قانونگذاران را متقاعد نمود. این بازاندیشی، از منافع مصرف‌کننده حمایت می‌کند و آزمایشگاه‌های مصوب، قانونی را برای استفاده از روش‌های مقرون به‌صرفه‌تر فراهم می‌کند [۲۴]. علیرغم صرفه‌جویی فوق‌العاده در زمان تشخیص با استفاده از روش‌های تشخیص مبتنی بر PCR در زمان واقعی، در مقایسه با روش مبتنی بر کشت سنّتی، هنوز یک محدودیت مهم در مرحله غنی‌سازی محیط کشت در خصوص تحلیل برای جمعیت اولیه به اندازه کافی بالا میکروارگانیسم‌ها (تقریبا ۱۰۴ CFU/ml) به‌منظور فعال کردن واقعی و تشخیص زمان PCR نهفته است.

تشخیص لیستریا مونوسایتوژنز[20] بیماری‌زا در مواد غذایی با روش RT-PCR

لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری پاتوژن است که باعث عفونت‌های جدی موضعی و عمومی در انسان می‌شود. این باکتری کاتالاز مثبت و بی‌هوازی اختیاری با محتوای توالی نوکلئوتیدی گوانین- سیتوزین[21] با وزن مولکولی و باندهای هیدروژنی بیشتر GC پایین بوده که نزدیک به گونه‌های باسیل، کلستریدیوم، انتروکوک، استرپتوکوک و استافیلوکوک هستند. روش‌های سنّتی تشخیص این پاتوژن شامل دو مرحله غنی‌سازی و جداسازی انتهایی در دو محیط کشت اختصاصی و تایید نهایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و یا مولکولی است؛ بنابراین، بیش از ۵ روز برای تایید نهایی نیاز دارد [۲۵]. نشانگرهای مولکولی مختلفی برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز انتخاب شده‌است که بیشتر آنها براساس عوامل تعیین کننده مانند ژن‌های actA، hly و iap و یا در ژن‌های آران‌ای[22] ریبوزومی مانند ۲۳ S RNA هستند.

رودریگز-لازارو[23] و همکارانش [۲۶] برای تشخیص گونه خاص لیستریا مونوسیتوژنز از دو روش RT-PCR و با کمک ژن‌های hly و iap استفاده کردند. هر دو روش سنجش، ۱۰۰ درصد اختصاصی بودند؛ همان‌طور که با استفاده از ۱۰۰ سویه لیستریا و ۴۵ سویه غیر لیستریا تعیین شد. حد تشخیص برای هر دو سنجش به یک معادل ژنوم صد تکرار معادل (۱۱-۵۶ درصد) تعیین شد که مطابقت عالی بین تعداد پیش‌بینی شده مقدار واقعی واحد تشکیل کلنی[24] در نمونه‌ها را نشان داد. لونگی[25] و همکاران [۲۷] روش مبتنی بر qPCR را برای تشخیص لیستریا مونوسیتوژنز در پنیرهای نرم ایتالیایی (موزارلا، کرسنزا و ریکوتا) طراحی کردند. در این روش، یک نمونه تیمار ساده براساس جوشاندن نمونه پنیر هموژن شده قبل از PCR استفاده شد. در ادامه سنجش qPCR و ژن عامل حرکت باکتری یا معروف به ژن ویرولانس actA[26] مورد هدف قرار گرفت. نتایج نشان داد که سطوح جمعیت میکروبی پاتوژن در نمونه‌های لبنیاتی نظیر پنیرهای موزارلا و کرسنزا (به ترتیب ۰/۴ و ۴CFU/g)، پایین‌تر از ریکوتا با حد تشخیص بود (۴۰ CFU/g). در فرآورده‌های گوشتی، از روش qPCR برای تشخیص کمّی لیستریا مونوسیتوژنز در این محصولات استفاده شد. روش qPCR براساس یک آزمایش PCR براساس ژن هدف hly در آزمایشگاه تحقیقاتی توسعه یافته بود. پروتکل‌های استخراج DNA باکتری برای محصولات مختلف گوشت خوک (گوشت خوک خام، سوسیس تخمیر شده خوک، ژامبون پخته شده و سوسیس فرانکفورتر) براساس کیت مخصوص و مراحل بعدی آن نظیر فیلتراسیون (با استفاده از فیلتر با اندازه منافذ ۲۲ تا ۲۵ میکرومتر و سپس از طریق یک غشای نایلونی (با اندازه منافذ ۱۱ میکرومتر) ایجاد شد. استخراج DNA نهایی، با استفاده از رزین چلکس-صد[27] ساخت کشورآلمان فراهم شد. این روش، امکان کمّی‌سازی هدف را تا ۱۰۲CFU/g لیستریا مونوسیتوژنز و تشخیص ۱۰۲CFU/g را در حداقل ۵۰ درصد تکرار فراهم کرد.

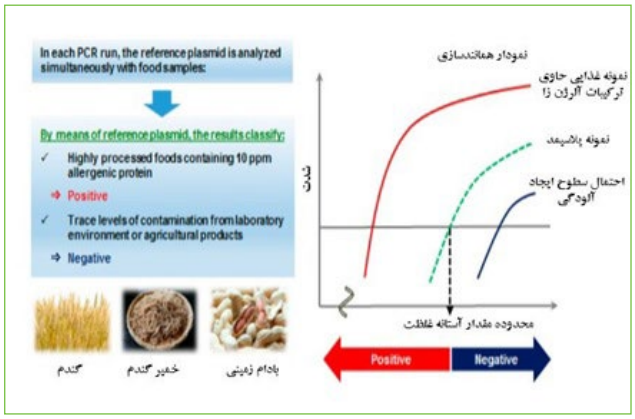
تشخیص پاتوژن‌های میکروبی براساس روش‌های مولکولی ممکن است بهترین رویکرد تحلیلی را نشان دهد تا مقامات تصمیم گیرنده را قادر سازد تا در سریع‌ترین زمان ممکن و با توجه به نتایج آلودگی مواد غذایی تصمیم بگیرند تا از ایمنی مواد غذایی اطمینان حاصل کنند و از شیوع بیماری‌های منتقل شده از طریق غذا جلوگیری نمایند [۲۸]. RT-PCR بیشتر برای ارائه نتایج کمّی طراحی شده‌است؛ با این حال در معرض بازدارنده‌های متعدد و منابع تنوع قرار می‌گیرد، به ویژه هنگامی که برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های پیچیده محیطی استفاده می‌شود. تنوع نیز می‌تواند به دسته‌های مختلف معرف استخراج DNA مرتبط باشد [۲۹]. هنگامی که غنی‌سازی با استفاده از روش بیشترین تعداد احتمالی حضور میکروارگانیسم زنده[28] و در ترکیب با روش RT-PCR اعمال شود، (شکل (۹)) ابزاری قوی و عملی برای تشخیص کمّی پاتوژن‌های بیماری‌زا فراهم می‌شود؛ همچنین تشخیص سلول‌های زنده و حذف سلول‌های مرده را تضمین می‌کند.

شکل (۹): تلفیق دو روش MPN در مجاورت با روش RT-PCR [۲۵].

تشخیص آلرژن‌های غذایی، به‌خصوص گلوتن با روش RT-PCR

به‌طور کلی، آلرژی‌های غذایی، در اثر واکنش بیش از اندازه سیستم ایمنی به برخی از ترکیبات غذایی یا موادی است که در اصل بی‌خطر هستند که نتیجه این درگیری در سیستم ایمنی منجر به تولید آنتی‌بادی ایمونوگلوبولین E[29] در آن خواهد شد. این واکنش‌های نامطلوب ممکن است ارثی یا ناشی از یک نقص

اکتسابی بیوشیمیایی باشد. علائم ممکن است در عرض چند دقیقه یا چند ساعت پس از خوردن آن غذای به‌خصوص، ظاهر شوند [۳۰]. نباید آلرژی را با واکنش‌های عدم تحمل مواد غذایی، واکنش‌های فارماکولوژی و واکنش‌های نیمه سمی که سیستم ایمنی در آن درگیر می‌کند، اشتباه گرفت. به‌عنوان مثال، بعضی افراد، مبتلا به نوعی بیماری سلیاک هستند؛ این افراد، نسبت به گلوتن موجود در فرآورده‌های غلات، عدم تحمل دارند در حالی که به خود ترکیبات غلات حساسیت ندارند. این بیماری، خود ایمنی و وراثتی است؛ غشای مخاطی روده کوچک فرد مبتلا پس از مصرف فرآورده‌های غله‌ای حاوی پروتئین گلوتن (اسیدهای آمینه موجود در پرولامین) آسیب دیده و دچار التهاب می‌شود [۳۱]. از این رو، امروزه تنها راه درمان این بیماری، استفاده از یک رژیم غذایی بدون گلوتن است. در میان روش‌های تشخیصی که در حال حاضر استفاده می‌شود، روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی (الایزا [۳۰] (آزمایش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم)) و دستگاه‌های جریان جانبی [۳۱] به‌طور سنّتی برای تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن استفاده می‌شوند، زیرا پروتئین‌های مهاجم را هدف قرار می‌دهند. طیف‌سنجی جرمی یکی دیگر از رویکردهای تحلیلی مبتنی بر پروتئین با کاربردهای جدید و امیدوارکننده در تشخیص، به ویژه غربالگری و تایید آلرژن‌های غذایی و گلوتن است. از دیگر روش‌های نوین برای تشخیص آلرژن‌های غذایی و گلوتن، روش فناوری‌های مبتنی بر DNA به‌خصوص RT-PCR است (شکل (۱۰)). این فناوری‌ها، آلرژن (پروتئین‌ها) را هدف قرار نمی‌دهند، بلکه DNA را به‌عنوان نشانگری برای حضور مواد آلرژی‌زا و گلوتن در محصولات غذایی هدف قرار می‌دهند. استفاده از این فناوری مبتنی بر DNA عاری از بحث نیست، زیرا نظرات متفاوتی در مورد مناسب بودن این روش‌ها برای تشخیص آلرژن‌ها نیز وجود دارد؛ در واقعیت این روش، ارتباط بین پروتئین مهاجم و محتوای DNA در غذاها را مورد هدف قرار می‌دهد [۳۲]. اجرای قوانین و مقررات جدید برچسب‌گذاری، عدم به کارگیری روش‌های تشخیصی مبتنی بر پروتئین برای برخی از آلرژن‌های جدید تعیین شده، مشکلات تحلیلی برخی از روش‌های ELISA و در نهایت، نیاز به روش‌های تاییدی غیر از ELISA منجر به ایجاد برخی از سنجش‌های مبتنی بر DNA در طول دوره چند سال گذشته شده‌است. در واقع، این موضوع نشان‌دهنده این است که آزمون‌های تحلیلی مبتنی بر DNA جایگاه خود را در تجزیه و تحلیل آلرژن‌های غذایی و گلوتن پیدا کرده است [۳۳].



شکل (۱۰): تشخیص آلرژن‌های غذایی با روش RT-PCR [۳۴].

در ارزیابی برخی از ترکیبات آلرژن، روش RT-PCR حساس‌تر از الایزا عمل می‌کند. با این حال، مطالعات بیشتری به‌منظور تعیین کاربرد روش RT-PCR به‌عنوان ابزار معمول برای ماتریس‌های غذایی خاص مورد نیاز است. واضح است که حداقل در مورد دو آلرژن اصلی غذایی، نظیر تخم‌مرغ و شیر، حساسیت روش PCR تاکنون نشان داد که نسبت به تشخیص پروتئین به مراتب پایین است و همچنین نمی‌تواند بین اجزای غیر حساسیت‌زای گوشت (گوشت مرغ، گوشت گاو) و پروتئین‌های آلرژیک واقعی (به‌عنوان مثال، اووآلبومین یا کازئین) تمایز قائل شود.

نتیجه‌گیری

کاربرد روش‌های مدرن مولکولی نظیر روش RT-PCR در تایید کیفیت ویژگی‌های کمّی میکروبیولوژیک، شناسایی گونه‌های پاتوژن و تشخیص آلرژن‌های غذایی (لبنیات و غلات) گسترش زیادی به‌خصوص در صنعت غذایی با نگاه میکروبی در دهه اخیر داشته است. روش RT-PCR نیازمند تجهیزات پیچیده‌تری است، اما بسیار دقیق بوده و نسبت به سایر روش‌های مبتنی بر DNA کم زحمت‌تر است. در این روش، از کاوشگرهای هیبریداسیون نشان‌دار شده با رنگ‌های فلورسنت در انتهای ′۳ یا ′۵ استفاده می‌شود، که امکان بررسی میزان محصول PCR را بدون جداسازی آنها و روش‌های الکتروفورز در ژل آگارز یا ژل پلی‌اکریل‌آمید می‌دهد.

در حال حاضر، عمده روش‌های شناسایی شامل تشخیص (۱)- پروتئین عامل آلرژی و (۲)- شناسایی DNA ترکیبات آلرژی‌زا مدنظر است. در همین راستا، روش‌های آزمایشگاهی مختلفی ابداع و استفاده شده‌اند که گاهی حساسیت بالایی داشته و قادرند ترکیبات آلرژن را در محدوده تعیین شده توسط مجامع رسمی و بین‌المللی (کمتر از ۱ میلی‌گرم تا بیشتر از ۱ گرم در هر کیلوگرم ماده غذایی یا بین ۱ ppm تا ۱۰۰) تشخیص دهند. علاوه‌بر این، کیت‌های تجاری متعددی با کاربری آسان و سریع نیز به بازار عرضه شده‌است و تلاش‌ها برای ورود فناوری‌های نوین به این عرصه همچنان ادامه دارد. هدف از این مقاله مروری؛ توصیف دقیق و طبقه‌بندی روش RT-PCR و دانش موجود در ارتباط با جنبه‌های شیمیایی تشخیصی qPCR و عملکرد آن در تشخیص گونه‌های پاتوژن غذایی و همچنین بررسی و تعیین کمّی آلرژن‌های غذایی در سال‌های اخیر است.

پی‌نوشت

1. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)
2. The polymerase chain reaction (PCR)
3. Quantitative PCR (qPCR)
4. Detector
5. YO-PRO-1
6. SYTO
7. BOXTO
8. BEBO
9. Melting curve
10. genetically modified organism (GMO)
11. The multiplex polymerase chain reaction (Multiplex PCR)
12. TaqMan
13. Hybprobe
14. FRET
15. Salmonella
16. Buffered Peptone Water (BPW)
17. Rappaport-Vassiliadis (RV)
18. Müller-Kauffmann tetrathionate novobiocin (MKTn)
19. Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD agar)
20. Listeria monocytogenes
21. GC-content (or guanine-cytosine content)
22. Ribonucleic acid (RNA)
23. Rodriguez-Lazaro
24. Colony-forming unit (CFU)
25. Longhi
26. virulence gene
27. Chelex-100
28. The most probable number (MPN) test (MPN)
29. Immunoglobulin E (IgE)
30. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
31. Lateral flow devices (LFDs)

مراجع

[1] Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Bio/technology, 10(4), 413-417.

[2] Nazarenko, I., Bhatnagar, S.K., and Hohman, R.J. (1997). A closed tube format for amplifcation and detection of DNA based on energy transfer. Nucleic Acids Res. 25, 2516–2521.

[3] Schmitgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J., and Reed, M.W. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay, comparison of endpoint and realtime methods. Anal. Biochem. 285, 194–204.

[4] Karbalaie-Niya, M. H., Mokhtari-Azad, T., Jondoghi, N. Z. S., & Yavarian, J. (2015). Detection of Oseltamivir resistant influenza A/H3N2 viruses by Real-time RT-PCR. Razi Journal of Medical Sciences, 22(133), 64-69.

[5] Kaltenboeck, B., & Wang, C. (2005). Advances in real-time PCR: Application to clinical laboratory diagnostics. Advances in clinical chemistry, 40, 219.

[6] Sadeghi, F., Salehi-Vaziri, M., Alizadeh, A., Ghodsi, S. M., Bokharaei-Salim, F., Fateh, A., ... & Keyvani, H. (2015). Detection of Merkel cell polyomavirus large T-antigen sequences in human central nervous system tumors. Journal of medical virology, 87(7), 1241-1247.

[7] Fraga D, Meulia T, Fenster S. (2008). Current protocols: essential laboratory techniques. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.

[8] Bengtsson, M., Karlsson, H. J., Westman, G., & Kubista, M. (2003). A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR. Nucleic acids research, 31(8), 45.

[9] Ahmad, A. I., & Ghasemi, J. B. (2007). New unsymmetrical cyanine dyes for real-time thermal cycling. Analytical and bioanalytical chemistry, 389, 983-988.

[10] Monis, P. T., Giglio, S., & Saint, C. P. (2005). Comparison of SYTO9 and SYBR Green I for real-time polymerase chain reaction and investigation of the effect of dye concentration on amplification and DNA melting curve analysis. Analytical biochemistry, 340(1), 24-34.

[11] Miotke, L., Lau, B. T., Rumma, R. T., & Ji, H. P. (2014). High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. Analytical chemistry, 86(5), 2618-2624.

[12] Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., & Balis, U. J. (1997). The LightCyclerTM: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques, 22(1), 176-181.

[13] Weissenborn, S. J., Wieland, U., Junk, M., & Pfister, H. (2010). Quantification of beta-human papillomavirus DNA by RT-PCR. Nature protocols, 5(1), 1-13.

[14] Gravel, A., Sinnett, D., & Flamand, L. (2013). Frequency of chromosomally-integrated human herpesvirus 6 in children with acute lymphoblastic leukemia. PLoS One, 8(12), e84322.

[15] Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. Biotechniques, 31(5), 1106-1121.

[16] Lazaro, D. R., Cook, N., & Pérez, M. H. (2013). Current Challenges in RT-PCR Diagnostics in Food Science. In RT-PCR in food science: current technology and applications (pp. 21-26). Caister Academic Press.
[17] Hoorfar, J., and Cook, N. (2003). Critical aspects in standardization of PCR. In Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens, K. Sachse and J. Frey, eds. (Totowa, USA: Humana Press), pp. 51–64.
[18] D'Agostino M., and Rodriguez-Lazaro, D. (2009). Harmonization and validation of methods in food safety – 'FOOD-PCR', a case study. In Global Issues in Food Science and Technology. Barbosa-Cánovas, G., Mortimer, A., Colonna, P., Lineback, D., Spiess, W., and Buckle, K., eds. (Maryland Height, USA: Academic press), pp. 199–209.
[19] Rodríguez-Lázaro, D., Lombard, B., Smith, H., Rzezutka, A., D'Agostino, M., Helmuth, R., ... & Cook, N. (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. Trends in food science & technology, 18(6), 306-319.
[20] Anonymous (2007a). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. (ISO 6579:2002/A1:2007) Amendment 1: Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
[21] Anonymous (2005a). Regulation (EC) No 2073/2005 of the European Parliament and of the Council of 15 November 2005 on the microbiological criteria for foodstuffs. Ofcial J. Euro. Union L338, 1–26.
[22] De Zuter, L., De Smedt, J.M., Abrams, R., Beckers, H., Cateau, M., de Borchgrave, J., Debevere, J., Hoekstra, J., Jonkers, F., and Lenges, J. (1991). Collaborative study on the use of motility enrichment on modifed semisolid Rappaport–Vassiliadis medium for the detection of Salmonella from foods. Int. J. Food Microbiol. 13, 11–20.
[23] Malorny, B., Löfström, C., Wagner, M., Krämer, N., and Hoorfar, J. (2008). Enumeration of Salmonella in food and feed samples by RT-PCR for quantitative microbial risk assessments. Appl. Environ. Microbiol. 74, 1299–1304.
[24] Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., GonzálezZorn, B., Wehland, J., and Kref, J. (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14, 584–640.
[25] Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scorti, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J.A., and Pla, M. (2004a). Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by RT-PCR: assessment of hly, iap and lin02483 targets and AmpliFluor technology. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1366–1377.
[26] Campbell, M.S., and Wright, A.C. (2003). RT-PCR analysis of Vibrio vulnifcus from oysters. Appl. Environ. Microbiol. 69, 7137–7144.
[27] Nordstrom, J.L., Vickery, C.L., Blackstone, G.M., Murray, S.L., and De Paola, A. (2007). Development of a multiplex RT-PCR with an internal amplifcation control for the detection of total and pathogenic Vibrio parahaemolyticus bacteria in oysters. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5840–5847.
[28] Varasteh, A., Jabbari, F., & Sankian, M. (2008). Food allergy. Journal of Birjand University of Medical Sciences, 15(2), 5-20.
[29] Abbaszadeh, F., Aalami, M., Kadkhodaee, R., Maghsoudlou, Y., & Sadeghi Mahoonak, A. (2023). Effect of Pickering Emulsion Stabilized by Soy Protein Nanoparticles on Physical and Rheological Properties of Gluten-Free Cake Batter. Journal of Food Processing and Preservation, 2023.
[30] Zeltner, D., Glomb, M.A., and Maede, D. (2009). RT-PCR systems for the detection of the gluten containing cereals wheat, spelt, kamut, rye, barley and oat. Eur. Food Res. Technol. 228, 321–330.
[31] Demmel, A., Hupfer, C., Ilg Hampe, E., Busch, U., and Engel, K.H. (2008). Development of a RT-PCR for the detection of lupine DNA (Lupinus species) in foods. J. Agric. Food Chem. 56, 4328–4332.
[32] Miyazaki, A., Watanabe, S., Ogata, K., Nagatomi, Y., Kokutani, R., Minegishi, Y., ... & Hirao, T. (2019). RT-PCR detection methods for food allergens (wheat, buckwheat, and peanuts) using reference plasmids. Journal of agricultural and food chemistry, 67(19), 5680-5686.
[33] Betazzi, F., Lucarelli, F., Palcheti, I., Berti, F., Marrazza, G., and Mascini, M. (2008). Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplifed detection of hazelnut allergens in foodstuffs. Anal. Chim. Acta 614, 93–102.
[34] Dahinden, I., von Büren, M., and Lüthy, J. (2001). A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. Eur. Food Res. Technol. 212, 228–233.

No.43 ■ Fall 2023 ■ Issue 3 ■ Volume 11
Iranian Journal of Laboratory Knowledge

Authors

Abbas Abedfar[1]*

Fatemeh Abbaszadeh[2]

* a.abedfar@guilan.ac.ir

1. Ph.D of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, University of Guilan

2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

An overview of the importance and classification of Real-Time PCR technique and its application in food industry

Abstract

The progress in the field of molecular technology and biology (caused to accelerate the correct identification of closely related species in a raw material and product) led to the frequency of molecular tests for wide applications such as genetic fingerprinting for identification, diagnosis of infectious diseases, food sensitivities and fraud detection in in the food industry it seems necessary. Certainly, using traditional methods (based on culture) to detect diseases, antibiotics, and harmful microorganisms in the food industry will be costly and take a lot of time. That's why modern molecular methods like RT-PCR were brought in. They can quickly and accurately determine the specific species that cause infections and assess the food's safety and quality. In this new method, fluorescent molecules are used to detect the gene amplification process. This allows for accurate measurement of gene expression levels with minimal risk of contamination. This technique is highly sensitive and specific, providing reliable data. So, it can be used instead of regular PCR. This article talks about the different methods of RT-PCR, why it's important, and how it can be used to detect allergens in food, like gluten. It also mentions how it can help uncover cases of food fraud.

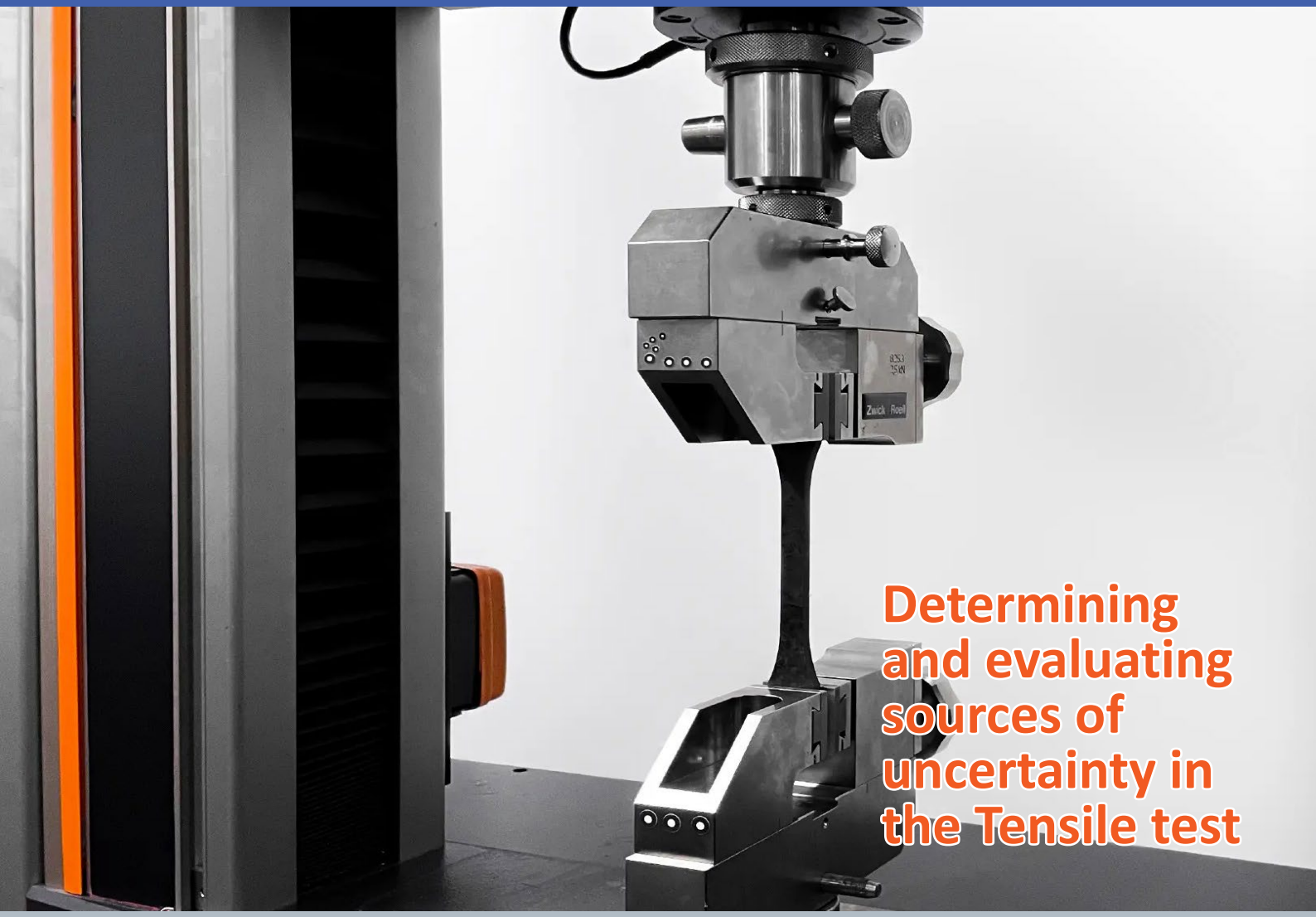
Keywords

RT-PCR technique; Technique classification; Detection of pathogenic bacteria; Detection of food allergens; Food fraud.

Iranian Journal of
laboratory Knowledge

ISSN 2538-3450

Volume 11 ▪ Issue 3 ▪ Fall 2023 ▪ No.43



Determining and evaluating sources of uncertainty in the Tensile test

Evaluating of the measurement uncertainty in laboratories by presenting an objective example

An overview of the importance and classification of Real-Time PCR technique and its application in food industry

Preparation of a nano-biocomposite film based on halloysite-chitosan as the sorbent for thin film microextraction

High-Order Calibration and Data Analysis in Chromatography

The role of the COMAR database for reference materials

www.IJLK.ir
info@ijlk.ir